گروه بندی ژنتیکی تعدادی سویه ریزوبیومی بومی خاکهای ایران با استفاده از تکنیکهای S-23S IGS PCR-RFLP١٦ و پروفیل پلاسمیدی

حسینعلی علیخانی*[۱] ، باقر یخچالی[۱،۲] و هانی آنتوان[۳]

[۱] کرج ، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی

[۲] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[۳] کانادا، کبک، دانشگاه لاوال، دانشکده کشاورزی

تاریخ دریافت: ۸۵/۰۱/۲٤ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰۸/۱۸

چکیده

دربین پروکاریوتها مجموعه‌ای از باکتریهای خاکزی که اصطلاحاً ریزوبیا نامیده می شوند بلحاظ توانایی‌درایجاد سیستم‌همزیستی تثبیت کننده نیتروژن مولکولی با گیاهان خانواده لگوم حائز اهمیت فراوانی هستند. توالی بین ژنهایrRNA 16S و rRNA 23S که اصطلاحاً S-23S IGS١٦ نامیده می‌شود از نظر اندازه وتوالی بسیار متفاوت بوده و ابزار مفیدی برای گروه بندی سویه های ریزوبیومی می باشد. دراین مطالعه تعداد ۵۲ سویه برتر ریزوبیومی که بعنوان عوامل محرک رشد گیاه (PGPR) شناخته شده‌اند، بطریق S-23S IGS PCR-RFLP١٦ و پروفیل پلاسمیدی(روش اکهارت) گروه‌بندی شد. نتایج حاصل نشان می دهد که IGS سویه های ریزوبیومی مورد مطالعه از نظر اندازه بسیار متنوع (600-1486 bp) است. بعلاوه تعداد نسخه های IGS سویه های مختلف نیز یکسان نبوده واز یک تا سه نسخه متفاوت می باشد. براساس روش S-23S IGS PCR-RFLP١٦ مجموع ۵۲ سویه ریزوبیومی در ٤٦ گروه مختلف قرار گرفت که افراد ۱۱ گروه دارای ۷۰ درصد تشابه بین سویه‌ای هستند. با استفاده از این روش بجز ۱۲ سویه‌ی*Bj* 54 و 53 *Bj*، *Rlv* 28 و ۲۷ *Rlv*، *Rlv* 24 و ۲۳ *Rlv*، *Rlp* 17 و ١٦ *Rlp*، *Sm* 13 و ۱۲ *Sm* و ۱۱ *Sm* و ۱۰ *Sm*، مابقی‌سویه ها (۷۷ درصد) کاملاً از یکدیگر تفکیک شد. بنابراین روش مذکور بدلیل سادگی و نیازهای اندک آزمایشگاهی (نسبت به سایر روشهای مولکولی) براحتی قابل انجام بوده و از کارآمدی و اطمینان بالایی نیز برخوردار است. گروه بندی مبتنی بر پروفیل پلاسمیدی سویه های مختلف ریزوبیومی مورد استفاده دراین تحقیق تا حدودی با نتایج حاصل از روش IGS PCR-RFLP هماهنگی دارد، بطور مثال سویه های ٥٤ *Bj* و ٥٣ *Bj* ، سویه های ٢٤ *Rlv* و ٢٣ *Rlv* ، همچنین سویه های ۱۷ *Rlp* و ١٦ *Rlp* و سویه های ۱۳ *Sm* و ۱۲ *Sm* و ۱۱ *Sm* درهر دو روش بصورت کاملاً مشابه درکنار یکدیگر و درون گروههای کلاستری جداگانه قرار گرفتند.

واژه های کلیدی : سویه‌های ریزوبیومی ، S-23S IGS PCR-RFLP١٦ ، پروفیل پلاسمیدی ، گروه بندی ژنتیکی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۲۵۵۷۷۰۹-۰۲٦۱ ، پست الکترونی: halikhan@ut.ac.ir

مقدمه

از آنجا که توصیف پروکاریوتهای خاکزی قبل از جداسازی آنها از خاک و تهیه کشت خالص فوق العاده سخت است، مطالعه تنوع زیستی (biodiversity) پروکاریوتها برای سالهای متمادی تقریباً متوقف بوده و فقدان اطلاعات قوی ریخت‌شناسی حاصل از مطالعه جوامع پیچیده پروکاریوتها مانع از شناخت دقیق ساختار جوامع میکروبی دراغلب

Archive of SID
www.SID.ir

اکوسیستمها شده است(۳). اما این وضعیت درنتیجه دستیابی محققین به تکنیکهای Targeted PCR Fingerprinting (TPF) و Random Amplified Polymorphic DNA PCR(RAPD-PCR) و Repetitive sequences PCR (rep-PCR) و... که همگی مبتنی بر PCR هستند تا حدودی مرتفع گردیده است (۸، ۱۰، ۱٤). در بین پروکاریوتها مجموعه ای از باکتریهای خاکزی که اصطلاحاً ریزوبیا نامیده می شوند بلحاظ توانایی درایجاد سیستم همزیستی تثبیت کننده نیتروژن ملکولی با گیاهان خانواده لگومینوز حائز اهمیت فوق العاده هستند(۱، ۲۰). طی یک دهه اخیر اطلاعات بسیار ارزشمندی درنتیجه کاربرد مجموعه ای از روشهای مولکولی مبتنی بر PCR درخصوص طبقه بندی و ارتباط ژنتیکی باکتریهای ریزوبیا حاصل شده است (۱۷،۱۰). براساس مطالعه توالی ژنهای S rRNA۱٦ که درسالهای اخیرمورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است، باکتریهای ریزوبیا مجموعه ای پلی فیلتیک می باشند که در چهار گروه فیلوژنتیکی اصلی از زیر شاخه α-2 و شاخه پروتئوباکتریا قرار گرفته اند. این باکتریها بطور معمول در سه سرده (جنس) مزوریزوبیوم، سینوریزوبیوم و ریزوبیوم قرار می گیرند که یکی از کلاسترهای ریزوبیا را تشکیل می دهند. بعلاوه سرده های (جنسهای) دیگر آن شامل آزوریزوبیوم و برادی ریزوبیوم می باشد که در بخش دیگر گروه فیلوژنتیکی قرار می گیرد(۲۰).

ژن S rRNA۱٦ یکی از ژنهائی است که درمطالعات فیلوژنتیکی باکتریها مورد استفاده فراوان دارد. این ژن از نظر اندازه ثابت و شامل بخشهای فوق العاده محافظت شده می باشد که بصورت مناطق موزائیکی دربین قطعات غیرحفاظتی(متغیر) قرار گرفته است. این مناطق حفاظت شده خصوصاً درتعیین میزان قرابت ژنتیکی و طبقه بندی پروکاریوتها حائز اهمیت فوق‌العاده زیادی است. گرچه چالشهائی نیز در مطالعه تغییرات جامعه زیستی خاک با استفاده از تفکیک و تمایز اختلافات ژنی بر اساس اندازه مولکول S rRNA۱٦ وجود دارد، ولی برخلاف ملکول S rRNA۱٦ ، استفاده از توالی بین ژنهای S rRNA۱٦ و S۲۳ که اصطلاحاً S- 23S IGS۱٦ نامیده می شود مشکل مذکور را بطور قابل ملاحظه ای کاهش می دهد (۱۲، ۱٤).

گارتلر و استاینسیچ (۱۹۹٦) و کاستمن و همکاران (۱۹۹۲)گزارش نمودند که منطقه S-23S IGS۱٦ از نظر طول قطعه و توالی آن حتی دربین گروههای تاکسونومیک (آرایه شناختی) با قرابت زیاد متفاوت است(۸ و٦). لذا مطالعه طول و ترکیب توالی نوکلئوتیدهای این قطعه، ابزار بسیار مفیدی برای مطالعه تغییرات زیستی و یا گروه بندی پروکاریوتها می باشد (۱، ۱۲، ۱۸).

بسیاری از باکتریها حاوی DNA غیر ژنومی بنام پلاسمید هستند که در دی ازوتروفها خصوصاً باکتریهای ریزوبیومی حاوی ژنهای لازم برای انجام فرآیند تثبیت نیتروژن اتمسفری هستند. باکتریهای ریزوبیومی معمولاً حاوی ٦-۱ پلاسمید بسیار بزرگ (Kb 600-100) به نام مگاپلاسمید هستند. مگاپلاسمیدها معمولاً حاوی ژنهای گره زایی (Nodulation, nod) ، ژنهای لازم برای انتخاب گیاه میزبان خاص (Host range specificity, hsn) و ژنهای لازم برای فرآیند تثبیت ازت مولکولی (N2 fixation, nif) می باشند. لذا اصطلاحاً پلاسمیدهای سمبیوتیک (یا سیمپلاسمید) و بطور اختصار pSym نامیده می‌شوند (۱ و ۲٤). مارتینز ـ رومرو و کابالیرو – میلادو (۱۹۹٦) نشان دادند که انتقال مگاپلاسمیدها نقش بسیار مهمی در تغییرات ژنتیکی و تکامل باکتریهای ریزوبیومی دارد (۱۳). همچنین ثابت شده است که می توان با وارد نمودن سیمپلاسمید به درون ریزوبیومهای غیر همزیست بار دیگر توان برقراری هم زیستی با گیاه لگوم را در آنها ایجاد نمود (۵، ۹، ۲۱).

تعداد و اندازه مگاپلاسمیدهای سویه های ریزوبیومی را می توان برای گروه بندی سویه های ریزوبیومی مورد استفاده قرار داد. تهیه پروفیل پلاسمیدی برای این منظور اغلب بر پایه روش اکهارت انجام می‌پذیرد (۲، ۲۱). در

Archive of SID
www.SID.ir

این تحقیق با استفاده از روش فوق و تکثیر و آنالیز S- ١٦ 23S IGS، 52 سویه ریزوبیومی محرک رشد گیاه (PGPR) بومی گروه بندی شد.

مواد و روشها

سویه های باکتری ، شرایط کشت و استخراج DNA: دراین تحقیق از تعداد ٥٢ سویه ریزوبیومی متعلق به ٤ جنس سینوریزوبیوم ، برادی ریزوبیوم ، ریزوبیوم و مزوریزوبیوم استفاده شده است. تکثیر ایزوله های ریزوبیومی بر روی محیط کشت مایع TY دردمای ٢٨ درجه سانتی گراد و بر روی شیکر دورانی در rpm120 انجام گرفت. استخراج DNA ژنومی مطابق روش پیشنهادی چن و کاو (١٩٩٣) بشرح زیر انجام شد (٢).

ابتدا باکتریهای ml5/1 از کشت مایع با دانسیتهٔ نوری ٠/٥ (OD_{620nm}) توسط سانتریفیوژ جدا شده و به آن ٢٠٠ میکرولیتر بافرلیزکننده: ٤٠ mM Tris-acetate pH 7.8 , 20 mM sodium- acetate , 1 mM EDTA ,1%SDS اضافه و سوسپانسیون یکنواختی ایجاد گردید. مقدار ٦٦ میکرولیتر محلول M Nacl٥ افزوده و به خوبی مخلوط و بمدت ١٠ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد در rpm12000 سانتریفیوژ شد. پس از جدا کردن مایع شفاف رویی هم حجم آن کلروفرم اضافه، کاملاً مخلوط و بمدت ٣ دقیقه در rpm12000 سانتریفیوژ شد. به مایع روئی اتانول ١٠٠ درصد به اندازه دو برابر حجم آن اضافه و به مدت ٢٤ ساعت دردمای ٢٠- سانتی گراد نگهداری شد. پس از سانتریفیوژر، محلول رویی خارج گردید. رسوب DNA دو نوبت با اتانول ٧٠ درصد شسته، و خشک و DNA حاصل در٥٠ میکرولیتر بافر TE 1X به آرامی حل شد. صحت DNA استخراج شده از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگاروز٠/٨ درصد بررسی و برای استفاده درمراحل بعدی تحقیق دردمای ٢٠- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

تکثیر قطعه S-23S IGS١٦ توسط PCR: برای تکثیر قطعه S-23S IGS١٦ از دو آغازگر پیش رونده (Forward) TGCGGCTGGATCACCT)FGPS 1490 (CCTT و پس‌رونده FGPS32 (Reverse) (CCGGGTTTCCCCATTCGG) استفاده شد (٢). پرایمراول ازقسمت انتهایی قطعه S١٦ و آغازگر دوم از قسمت ابتدایی قطعه S٢٣ طراحی‌شد. واکنش PCR درحجم نهایی ٥٠ میکرولیترشامل مقادیر : 1µ 1 از نمونه DNA، 1 µl از هر کدام از پرایمرهای پیش رونده و پس رونده (µM5)، 8 µl مخلوط (1250µM) dNTPs، µl5 بـــافر ١٠ X PCR، 5 /1 µl از محلول ($MgCl_2$ (50^{mM}، U 5/1 آنزیم (Tag DNA polymerase (5u/µl و بعلاوه µl 32 آب دوبار تقطیر فاقد یون توسط دستگاه ترموسایکلرمدل PERKIN ELMER CETUS 480 با پریـــود دمایـــی : ٥ دقـیقه ٩٥ درجه سانتی گراد و سپس طی ٣٥ سیکل متوالی شامل: ١ دقیقه در ٩٥ درجه سانتی گراد، ١ دقیقه در ٥٦ درجه سانتی گراد و ٢ دقیقه در ٧٢ درجه سانتی گراد انجام گرفت.

صحت انجام فرایند PCR توسط الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز ٠/٨ درصد به مدت یک ساعت در٥٠ ولت بررسی شد.

محصول نهایی PCR با استفاده از کیت QlAquickR spin خالص‌سازی شد و برای استفاده درمراحل بعدی تحقیق در دمای ٢٠- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

برش آنزیمی محصولات IGS PCR و آنالیز IGS PCR-RFLP : بررسی اندازه و مقایسه طول قطعات IGS سویه‌های ریزوبیومی، با الکتروفورز محصول PCR هر نمونه بر روی ژل آگاروز انجام شد. آزمون تناسب آنزیم (Enzyme suitability test) برای انتخاب مناسب ترین آنزیم اندونوکلئاز برای برش قطعات IGSبا استفاده از ٨ آنزیم مختلف (*Hae* III, *Dde* I, *Cfo* I, *Rsa* I, *Alu* I, *Hinf* I, *Hha* I, *Msp* I, from Roche, Germany) انجام و از بین

Archive of SID
www.SID.ir

آنها ٦ آنزیم Hae III، Hha I، Hinf I، Alu I، Dde I و Rsa I برای تهیه الگوی برش قطعات IGS انتخاب گردید. واکنش برش آنزیمی مطابق دستورالعمل شرکت سازنده آنزیم انجام شد. نمونه های IGS برش داده شده توسط هر آنزیم بر روی ژل آگاروز ۳ درصد الکتروز و پس از رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید تصویربرداری شد.

استخراج پلاسمید: تهیه پلاسمید به روش اکهارت (با اصلاحات جزیی) و لیز سلول درون چاهکهای ژل (in-gel lysis method of Eckhart) آگاروز ۰/۷ درصد انجام شد. دراین روش سلولهای 5/1 mlکشت ریزوبیومی از محیط کشت TY با دانسیته نوری ۰/۲ OD_{620nm} رسوب داده شد. رسوب باکتری ریزوبیومی طی دو مرحله ، ابتدا با 500µl l آب مقطر استریل و سپس با محلول ۰/۳ درصد سدیم سارکوزینات شسته و مقدار 40µl l محلول TE10mM+2%FiColl به آن اضافه و پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در یخ مقدار10µl l از محلول لیز کننده: [TE(10mM)+RNAs A(0.4mg/ml) +lysosyme (1mg/ml)+Bromophenol Red (1mg/ml)] بهر لوله افزوده شد. آنگاه تمامی محتویات لوله‌ها در چاهکهای ژل آگاروز ۰/۷ درصد حاوی 125µl l محلول + SDS 10% xylene cyanol FF (1mg/ml) قرار داده شد. الکتروفورز در دو مرحله؛ اول ـ بمدت نیم ساعت در ٤٠ ولت و سپس ۱۲ ساعت در ۱۰۰ ولت درون سردخانه (٤ درجه سانتی گراد) انجام گرفت. ژلهای مذکور پس از رنگ آمیزی درمحلول اتیدیوم بروماید، با نور UV بررسی و تصویربرداری شد (٤).

نتایج و بحث

آنالیز IGS PCR-RFLP

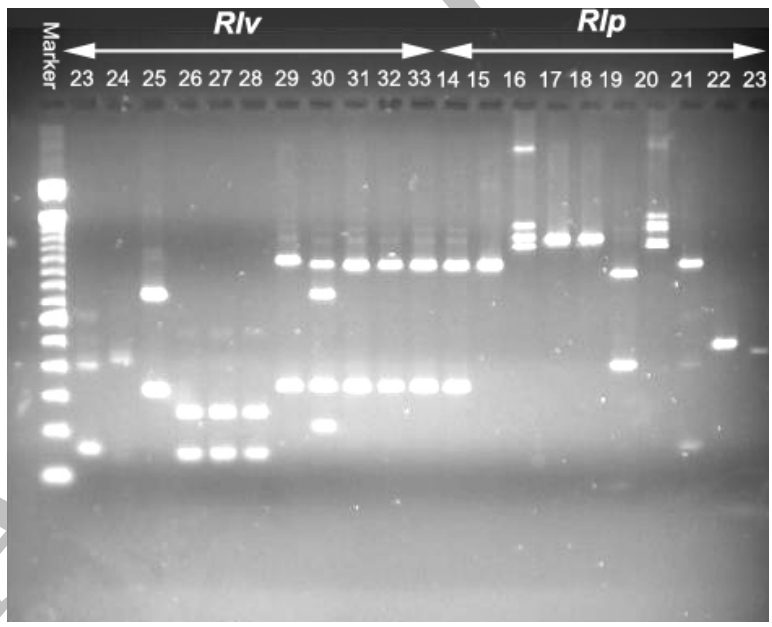
الف)ـ اندازه و تعداد قطعات IGS تکثیر شده بوسیله PCR: آزمون انجام شده برای انتخاب مناسب‌ترین آنزیم جهت برش قطعات IGS باکتریهای ریزوبیومی نشان داد که تعداد ٦ آنزیم از مجموع ۸ آنزیم مورد استفاده دارای بیشترین کارایی در برش قطعات IGS می‌باشند که بر حسب کارایی در دو گروه آنزیمهای *Hae* III , *Hha* I, *Hin*f I با کارایی نسبتاً بیشتر و آنزیمهای *Rsa* I, *Dde* I, *Alu* I با کارایی نسبتاً کمتر قرار گرفتند.

اندازه‌ی طول قطعه (ها)ی S-23S IGS١٦ در سویه های مختلف ریزوبیومی از دوطریق ؛ اندازه‌گیری قطعات محصول PCR IGS قبل از برش آنزیمی و مجموع اندازه ی قطعات DNA حاصل از برش آنزیمی محصول IGS PCR توسط آنزیمهای سه گانه سری اول (*Hin*fI، *Hha* I و *Hae* III) درمقایسه با مارکر اندازه مولکولی (invitrogen,100bp) DNA تخمین زده شد (شکل ۱). نتایج حاصل نشان داد که طول قطعه‌ی IGS سویه های ریزوبیومی بسیار متفاوت و از 600 bp (سویه Rlp ۲۱) تا 1486 bp (سویه های ٣٦ *Rlp*, 19 *Rlt*, 34 *Rlt*) متغیر است.جنسن و همکاران (۱۹۹۳) ، نورمند و همکاران (۱۹۹٦) همچنین کاترینی وهمکاران (۲۰۰۲) نیز طول قطعه S-23S IGS١٦ سویه های ریزوبیومی را درمقایسه با دیگر باکتریهای خاکزی بسیار متفاوت و بزرگتر گزارش کرده اند (۷، ١٤، ١٨). کاترینی و همکاران (۲۰۰۲) طول قطعه S-23S IGS١٦ را در باکتریهای سرده (جنس) برادی ریزوبیوم حدود bp800 ، سرده (جنس) مزوریزوبیوم bp900-800 ، گونه ریزوبیوم لگو مینوزاروم حدود bp1100 ودر سرده (جنس) سینوریزوبیوم bp1300-1100 گزارش کرده اند (۱۸). جدول شماره ۱ اندازه قطعه (ها)ی IGS سویه های مورد بررسی را نشان می دهد. تفاوت دراندازه قطعات IGS را می توان عمدتاً مربوط بتعداد و نوع ژنهای tRNA موجود درمنطقه IGS دانست (۱، ۱۲). گو و همکاران (۱۹۹۹) حذف یا اضافه شدن (Insertion or Deletion) DNA را دلیل دیگری برای اختلاف در طول قطعه IGS در سویه های مختلف می دانند (۵). بطورکلی در ٤٤ درصد از سویه های ریزوبیومی مورد مطالعه طول قطعه IGS کمتراز 1000 bp ودر ٥٦ درصد از

Archive of SID

www.SID.ir

سویه ها درحـــدود 1000-1400 bp می‌باشد. بیشترین تفاوت در اندازه IGS دربین سویه های *Rlp* (bp600 - 1486) واز طرف دیگر بیشترین تشابه اندازه IGS دربین سویه های *Rlt* (bp 1290-1486) می باشد. در اندازه‌گیری طول قطعه اصلی IGS از طریق مستقیم در مقایسه با مجموع اندازه قطعات DNA حاصل ازبرش برخی از آنزیمها هماهنگی نسبتاً قابل قبولی مشاهده می‌شود. بطور مثال در ٤٢ سویه (حدود ۸۰ درصد) مجموع اندازه قطعات IGS حاصل از برش آنزیم *Hinf* I با طول قطعه‌ی اصلی IGS کمتر از ۲۰ درصد اختلاف دارد . برای آنزیم *Hha* I این اختلاف اندازه IGS (اختلاف کمتر از ۲۰ درصد) در ۲۵ سویه (٤٨ ٪ سویه ها) و برای آنزیم *Hae* III تنها در١٤ سویه (۲۷ درصد سویه ها) مشاهده می شود. لذا بیشترین هماهنگی بین مجموع اندازه‌ی قطعات DNA حاصل از برش آنزیمی قطعه‌ی IGS با اندازه‌ی طول قطعه‌ی اصلی IGS (قبل از برش) مربوط به آنزیم *Hinf* I و کمترین آن مربوط به آنزیم *Hae* III است و این بدان معنا است که درنتیجه برش قطعه‌ی IGS با آنزیم *Hae* III قطعات بسیار کوچک DNA حاصل می شود که بر روی ژل آگاروز ۳ درصد قابل تشخیص و اندازه گیری نمی باشد. برعکس نتیجه برش قطعه IGS با آنزیم *Hinf* I تولید قطعات بزرگتر و قابل تشخیص DNA، بر روی ژل آگاروز ۳ درصد می‌باشد. این نتایج نشان دهنده وجود تفاوت در توالی قطعات IGS سویه های مختلف است.



شکل۱- الگوی برش S-23S IGS DNA١٦ سویه های *Rlv, Rlp* توسط آنزیم *Hinf* I مارکر DNA: 100-2020 bp invitrogen

تعداد نسخه (ها)ی IGS تکثیر شده توسط PCR در سویه های مختلف ریزوبیومی نیز یکسان نمی باشد (جدول۱) این تعداد دربین سویه های ریزوبیومی از یک تا سه نسخه متفاوت است. درمجموع از بین ۵۲ سویه ریزوبیومی مورد مطالعه، تعداد ۳۹ سویه (۷۵ درصد) دارای یک نسخه IGS ، 4 سویه (۷/۷ درصد) دارای ۲ نسخه IGS و تعداد ۹ سویه ریزوبیومی (۱۷/۳ درصد) هر کدام ۳ نسخه IGS دارند. بیشترین یکسانی از نظر تعداد نسخه های IGS

www.SID.ir

دربین سویه های *Bj* (همگی دارای یک نسخه IGS) و بیشترین اختلاف در بین سویه های 5)*Rlv* سویه هر کدام سه نسخه و ٦ سویه دیگر هرکدام یک نسخه) مشاهده می شود.

ب) ـ گروه بندی سویه های ریزوبیومی: برای گروه بندی سویه های ریزوبیومی بر اساس IGS PCR-RFLP از نرم افزار Phylip version 3.6a3 استفاده شد. با توجه به اختلاف قابل توجه مشاهده در اندازه و تعداد نسخه های قطعات IGS سویه های ریزوبیومی مورد مطالعه، ابتدا نحوه‌ی ارتباط ژنتیکی بین سویه ها براساس مشخصات (اندازه‌ی طول وتعداد) قطعات IGS تکثیر شده توسط PCR (قبل از هر گونه هضم آنزیمی) و از طریق ترسیم درخت ژنتیکی (Dendrogram) و گروه‌بندی آنها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳ A). گروه بندی حاصله نشان می دهد، تعداد ۵۲ سویه‌ی ریزوبیومی موجود که مربوط به ۷ گـــــروه (جنس(سرده) ، گونه و بیووار) مختلف می باشند از این طریق در ١٦ گروه مختلف قرار می گیرند که اعضای بسیاری از شاخه ها بدون اختلاف (تفکیک) درکنار یکدیگرقرار دارند. دربین سویه‌های *Sm* ، تعداد سه سویـــــه (٢ *Sm* و ٣ *Sm* و ٤ *Sm*) بصورت مجزا قرار می گیرند. سویه های ١٣ *Sm* و ١٢ و ١١ و ١٠ و ٩ نیز بدون هیچگونه اختلاف و درکنار یکدیگر درگروه ٤ قرار دارند. سویه های ٧ *Sm* و٦ و ٥ ضمن ٥٠ درصد اختلاف با سویه های ٢٤ *Rlv* و ٢٣ همگی درگروه ٣ واقع می شوند. سویه ٨ *Sm* در نزدیکی سویه های ٣٣ *Rlv*، 30، 29، 26 و ٣٥ *Rlt* قرار می گیرد. سویه‌های ٣٦ *Rlt* و ٣٤ نیز با حدود ٧٠ درصد تشابه در نزدیکی سویه های *Sm* درگروه ٤ قرار دارند. سویه های کند رشد ٥١*Bj* و ٥٠ درکنار سویه کند رشد ٣٧ *Bsp* (در شاخه ١٥) و سـویـــه های تـــند رشد ٥٤ *Bj* و ٥٣ درکنار سویـــه های ٤٧ *Mc* و ١٥ *Rlp* (درشاخه ١٤) واقع شده اند. سویه های *Rlp* نیز بصورت مجزا و یا عمدتاً در گروه ٥ قرار می گیرند. از بین سویه های جنس مزوریزوبیوم ، سویه های ٤٨ Mc و ٤٦ بصورت مجزا ولی سویه های ٤٣ *Mc*، 42، 41، 40 همراه با سویه ٥٢ *Bj* می باشند ، ضمناً سویه‌ی ٤٧ *Mc* درکنار سویه های تند رشد ٥٤ *Bj* و ٥٣ در گروه ١٤ و سویه‌ی ٤٤ *Mc* در کنار سویه‌های ١٩ *Rlp*، 17، 16 قرار می گیرند. این وضعیت نشان می دهد که سویه های *Sm* از نظر طول و تعداد قطعات IGS بیشترشبیه سویه های *Rlv* و *Rlt* می‌باشند. درمقابل سویه های مزوریزوبیوم که بصورت مجزا و یا همراه با سویه های کند رشد و تند رشد*Bj* وحتی برخی سویه های *Rlp* هستند دارای پراکنش بین گروهی فراوانی می باشند که با ماهیت و نحوه‌ی رفتاری این گروه از نظر سرعت رشد نیز هماهنگی دارد. کاتریـــنی و همکاران (٢٠٠٢) همچنین نور و همکاران (b و a 1994) با استفاده از تکنیک S-23S IGS PCR-١٦ RFLP نشان داده اند که ناهمگنی زیاد بین سویـــه های سرده (جنس) مزوریزوبیوم، دارای قدرت تلقـیح به گیاه نخود (Cicer arietinum)، وجود دارد (١٥، ١٦، ١٨). **الگوی برش آنزیمی قطعه‌ی ٢٣S - 16S IGS سویه‌های مختلف ریزوبیومی توسط هر کدام از آنزیمهای سه گانه سری اول شامل *Hinf* I و *Hha* I و *Hae* III تهیه (شکل ١) و با توجه به الگوی ترکیبی هضم آنزیمهای سه گانه مذکور اقدام به ترسیم درخت ژنتیکی وگروه بندی سویه ها شد (شکل ٣–B). براین اساس مجموع ٥٢ سویه ریزوبیومی مورد مطالعه در ٣٦ گروه مختلف قرار گرفت. افراد ١١ گروه (شامل ٣١ سویه) از مجموع ٣٦ گروه حدوداً دارای ٧٠ درصد تشابه بین سویه ای می باشند. و تعداد ٢١ سویه ریزوبیومی بصورت مجزا قرار می گیرند. جدول شماره ١ وضعیت گروه های کلاستری ١٢ گانه‌ی (با تشابه درون گروهی بیش از ٧٠ درصد) و سویه های مربوطه را نشان می دهد.**

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۱ ـ مشخصات مربوط به طول و تعداد نسخه های IGS سویه های ریزوبیومی و گروه بندی آنها بر اساس S-23S IGS PCR-RFLP١٦

گروه بندی سویه ها بر اساس IGS PCR RFLP (حدود ۷۰٪ تشابه)	مجموع اندازه‌ی قطعات حاصل از برش IGS (bp)			اندازه IGS (bp) قبل از برش آنزیم	تعداد قطعات IGS	گیاه میزبان	کد سویه
	Hae III	*Hae* I	*Hinf* 1				
جدا	۸۵۵	۷٦۸	۵۷۵	٦۲۵+٦۷۷+۷٦۷ (۲۰٦۹)	۳	یونجه	2 Sm
جدا	۲۸۱	٤۲۳	٤۱۵	٦٦۵	۱	″	3 Sm
جدا	۷۳۷	۱۰٤۸	۱۰۷۵	۱۰۹۸	۱	″	4 Sm
G1	٤۷۵	٤۹۰	٤۲۵	٦۲۵	۱	″	5 Sm
G1	٤۷۵	٤۹۰	٤۲۵	٦۲۵	۱	″	6 Sm
G1	٤۷۵	٤۹۰	٤۲۵	٦۲۵	۱	″	7 Sm
G2	۷۸۵	۱۰۵۹	۹۹۸	۱۳۵۲	۱	″	8 Sm
G2	۸٤٦	۱۱۹۱	۹۹۷	۱۲۹۰	۱	″	9 Sm
G2	۸٤٦	۱۱۹۱	۹۹۸	۱۲۹۰	۱	″	10 Sm
G2	۸٤٦	۱۱۹۱	۱۰٦۵	۱۲۹۰	۱	″	11 Sm
G2	۸٤٦	۱۱۹۱	۱۳۳۳	۱۲۹۰	۱	″	12 Sm
G2	۸٤٦	۱۱۹۱	۱۳۳۳	۱۲۹۰	۱	″	13 Sm
جدا	٦۲۹	۸۵۳	۸۹۵	۹۲٦	۱	لوبیا	14 Rlp
جدا	۹۹۹	۹٦۳	۹۵۸	۱۳۵۲+۱۲۳۰+ ۱۰٦۷ (۳٦٤۹)	۳	″	15 Rlp
G3	۱۰۷۱	۷۲۷	۱۱۲۲	۱۱۷۳	۱	″	16 Rlp
G3	۱۰۷۱	۷۲۷	۱۰۹۵	۱۱۷۳	۱	″	17 Rlp
جدا	۱۰۲۱	۱۰۸٦	۹۳۹	۱۲۹۰	۱	″	18 Rlp
جدا	۷۰۳	۱۷٦٤	۷۱۷	۱٤۸٦+۱۳۵۲+۱۱۷۳ (٤۰۱۱)	۳	″	19 Rlp
جدا	۱٤۱	۷۳٦	۲٤۹	۹۷۱+٦۵۰+٦۷۸ (۲۲۹۹)	۳	″	20 Rlp
جدا	۱۷۵	٤۱۸	٤۸۹	٦۰۰	۱	″	21 Rlp
جدا	۲۲۰	۵۸۰	٦۳۰	٦۳٤	۱	″	22 Rlp
G4	۵۱۳	۵۳۹	٤٤۲	۷۳۱+۵۷۷+۵۲۵ (۱۸۳۳)	۳	باقلا	23 Rlv
G4	۵۱۳	٤۳۹	٤٤۲	۷۳۱+۵۷۷+۵۲۵(۱۸۳۳)	۳	″	24 Rlv
جدا	۹۸۷	۱۲٤۹	۱۳۸۰	۱٤۱۸	۱	″	25 Rlv

Archive of SID

www.SID.ir

26 Rlv	″	۱	۱۳۵۲	۱۳۱٦	۱۳۱۹	۹۲۲	G4
27 Rlv	″	۳	۹۲٦+۷۳۱+٦۷۵ (۲۳۳۲)	۷٦۵	۲۱۷۱	۲۰۸	جدا
28 Rlv	″	۳	۹۲٦+۷۳۱+٦۷۵(۲۳۳۲)	٦٦۵	۳۷۱	۷۰۸	G5
29 Rlv	″	۱	۱۳۵۲	۱۳۱٦	۱۱۷۵	۹۰٤	G6
30 Rlv	″	۱	۱۳۵۲	۱۳۰۲	۱۳۱۱	۹۰٤	G6
31 Rlv	″	۳	۹۲٦+۷۳۱+٦۵۰(۲۳۰۷)	۷٦۵	٦٦۲	۵۰۸	G5
32 Rlv	عدس	۱	۱۲۹۰	۱۱۵٦	۱۰٦۵	۱۰٤۵	جدا
33 Rlv	″	۱	۱۳۵۲	۹۱۲	۸۱۱	۸۹٤	G6
34 Rlt	شبدر	۲	۱٤۸٦+۱۲۹۰ (۲۷۷٦)	۸۰۳	۹۷۹	۷۸۲	جدا
35 Rlt	″	۱	۱۳۵۲	۹٦۷	۸۵۳	۹۲۸	G7
36 Rlt	″	۲	۱٤۸٦+۱۲۹۰ (۲۷۷٦)	۸۰۳	۸۷۳	۸۲۸	G7
37 Bsp	بادام زمینی	۱	۸۸۳	۸۱۷	۸۵۷	۷۹۸	جدا
38 Bsp	″	۲	٦۷۰+٦۸۰(۱۳۵۰)	٦۱٤	٦۹۳	۳٤۷	جدا
40 Mc	نخود	۱	۹۷۱	۸۷٤	۷٤۲	۷۹۸	G8
41 Mc	″	۲	۹۷۱+۹۲٦ (۱۸۹۷)	۸۱۷	٦۷٦	۵٤۲	G8
42 Mc	″	۱	۹۷۱	۸۸۹	۷٦۲	۷٦۳	G8
43 Mc	″	۱	۹۷۱	۷۸۹	٦٤٦	۸۲۷	G8
44 Mc	″	۱	۱۱۷۳	۱۰۳۰	٤۲۰	٦۵۰	جدا
45 Mc	″	۱	۱۰٦٤	۹٤۵	۳٤٤	۷۹۸	G9
46 Mc	″	۱	۱۱۱۹	۹۷۵	۵۹٦	۸۵۳	G10
47 Mc	″	۱	۱۲۳۰	۱۲۱٤	۳۲۵	٦۸۱	جدا
48 Mc	″	۱	۱۰۱۸	۹۸۹	۷٦۲	۷۲۹	G8
49 Mc	″	۱	۱۰٦٤	۸۷٤	۵۹٦	۸۲۷	G10
50 Bj	سویا	۱	۸۸۳	۷۸۸	۸۲۳	۵٤٤	G11
51 Bj	″	۱	۸۸۳	۷٤۲	۸۱۲	۵٤٤	G11
52 Bj	″	۱	۹۷۱	۷۸٤	۵۵۷	۷۸٤	G9
53 Bj	″	۱	۱۲۳۰	۸۱٤	٦۰۱	۹۷۰	G12
54 Bj	″	۱	۱۲۳۰	۹۱٤	٦۰۱	۹۷۰	G12

Archive of SID

www.SID.ir

دندوگرام ترسیم شده نشان می دهد که بجز سویه های ٤ *Sm* و ۳ و ۲ که به صورت مجزا قراردارند مابقی سویه های *Sm* درون گروه های G2 و G1 قرار می گیرند و این موضوع حاکی از تشابه درون گروهـــی (بین سویه ای) آنها می‌باشد. درعوض تمامی سویه های *Rlp* بجز سویه های ۱۷ *Rlp* و ۱٦ بصورت مجزا می باشند. گروه های G6 و G5 و G4 حاوی تمامی سویه های *Rlv* (به استثنای سویه های ۳۲ *Rlv* و ۲٦) است. سویه های *Rlt* نیز درون گروهG7 قرار گرفته اند وسویه‌ی ۳٤ *Rlt* با اندکی اختلاف (حدود ۱۵درصد) بصورت جداگانه قرار دارد. همچنین سویه های تند رشد *Bj* 54) *Bj* و ۵۳) درون گروه G12 واقع شده و گروه G11 نیز حاوی سویه های کند رشد ۵۱ *Bj* و ۵۰ می‌باشد دیگر سویه‌ی کند رشد ، ۵۲ *Bj*، با اختلاف بسیار کم (کمتر از ۵ درصد) همراه با سویه ٤۵ *Mc* درون گروه ۹ G قرار گرفته است. اغلب سویه‌های *Mc* شامل ٤۸ *Mc* و ٤۳ و ٤۲ و ٤۱ و ٤۰ درون گروه G8 قرار گرفته اند . گروه G10 نیز شامل سویه‌های 49 *Mc* و ٤٦ می باشد سویه های ٤۷ *Mc*، 44 نیز بصورت مستقل قرار گرفته اند. همچنین دندوگرام حاصل از الگوی ترکیبی برش آنزیمهای سه گانه نشان می دهد که ۱۵ سویه ریزوبیومی شامل سویه های ۷ *Sm* و ٦ و ۵ (گروه G1) ، سویه های ۱۳ *Sm* و ۱۲ و ۱۱ و۱۰ (گروه G2) ، همچنین سویه های ۱۷ *Rlp* و ۱٦ (گروه G3) ، سویه های ۳٤ *Rlv*، 23(گروه G4) ، سویه های ۲۸ *Rlv* و ۲۷ (گروه G5) ونیز سویه های ۵٤ *Bj* و ۵۳ (گروه G12) بدون اختلاف درون گروه های کلاستری مربوط به خود قرار گرفته اند. بطورکلی با استفاده از سه آنزیم سری اول ونیز الگوی ترکیبی برش این سه آنزیم تعداد ۳۷ سویه (۷۱/۲ درصد) از مجموع ۵۲ سویه ریزوبیومی مورد مطالعه کاملاً از یکدیگر تفکیک شد.

برای مطالعه ارتباط ژنتیکی و امکان تفکیک تعداد ۱۵ سویه ریزوبیومی که آنزیمهای سه گانه سری اول قادر به تمیز بین آنها نبود از آنزیمهای سه گانه سری دوم شامل *Alu* I، *Dde* I، *Rsa* I استفاده گردید. الگوی برش هرکدام از این آنزیمها ونیز الگوی ترکیبی برش آنزیمهای مذکور برای ۱۵ سویه باقی مانده تهیه شد. در الگوی برش هر دو آنزیم *Alu* I و *Rsa* I سویه های ۵۳ *Bj* و ۵٤ *Bj* از یکدیگر تفکیک شد در صورتیکه آنزیم *Dde* I قادر نبود تفاوت بین این دو سویه را نشان دهد. بعلاوه دراثر آنزیم *Alu* I سویه های ۱۰ *Sm* و ۱۳ *Sm* از مجموعه‌ی تفکیک نشده‌ی ۱۳ *Sm* و ۱۲ و ۱۱ و ۱۰ جدا شد. تمامی چهار سویه‌ی ریزوبیومی تفکیک شده با آنزیمهای *Alu* I و *Rsa* I (شامل ۵٤ *Bj* و ۵۳ و نیز ۱۳ *Sm*، 10) کماکان دارای حدود ۷۰ درصد تشابه بین گروهی می باشند و لذا درون کلاسترهای مربوطه خود قرار می گیرند. مابقی مجموعه های تفکیک نشده سویه های ریزوبیومی بعلت عدم تأثیر آنزیمهای سه گانه سری دوم به همان صورت درون گروههای کلاستر G1 و G3 و G4 و G5 باقی ماندند. اثر آنزیمهای سری دوم تنها منجر به تفکیک ۲۰ درصد از سویه های تفکیک نشده (۱۵ سویه) شد.

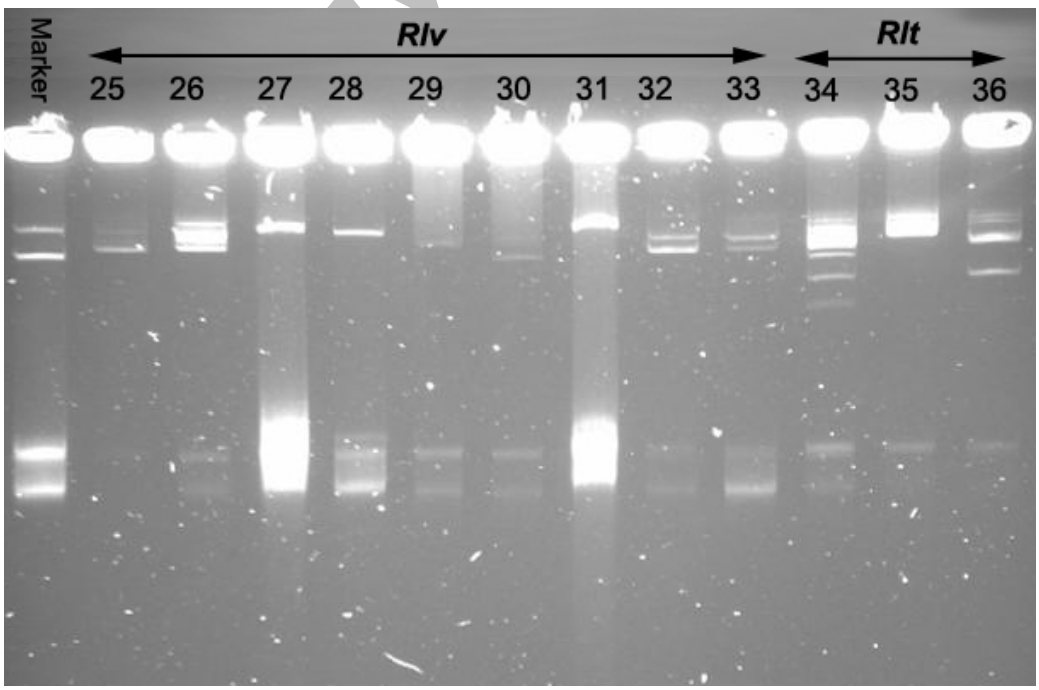
نتایج این تحقیق نشان می دهد که اولاً تنوع ژنتیکی فراوانی بین سویه های ریزوبیومی یک گونه و حتی بیووار مشاهده می‌شود. این نتیجه با مشاهدات بسیاری از محققین دیگر دراین زمینه همخوانی دارد (۱،۳، ۵، ۱۳). ثانیاً اینکه روش S-23S IGS PCR-RFLP۱٦ قادر است تفاوت بین سویه های ریزوبیومی مورد مطالعه را که اختلاف آنها از جهات مختلف قبلاً ثابت شده است، بخوبی ودر حد قابل قبولی نشان دهد. بطوریکه با استفاده از ایـــن روش تعـــداد ٤۰ سویـــه (۷۷ درصد) از مجموع ۵۲ سویه مورد مطالعه بخوبی و مشخصاً از یکدیگر تفکیک شد. بارسیر و همکاران (۲۰۰۲) همچنین لاگری و همکاران (۱۹۹٦و۱۹۹٤) نیز ثابت نمودند که قدرت تشخیص و تفکیک باکتریهای ریزوبیومی در سطح سویه توسط روش S-23S IGS PCR-RFLP۱٦ نسبت به روشهای دیگر همچون تعیین توالی منطقه S rRNA۱٦ ویا تکنیک RFLP این منطقه (S ARDRA۱٦) بسیار بیشتر است (۱، ۹، ۱۰).

Archive of SID

www.SID.ir

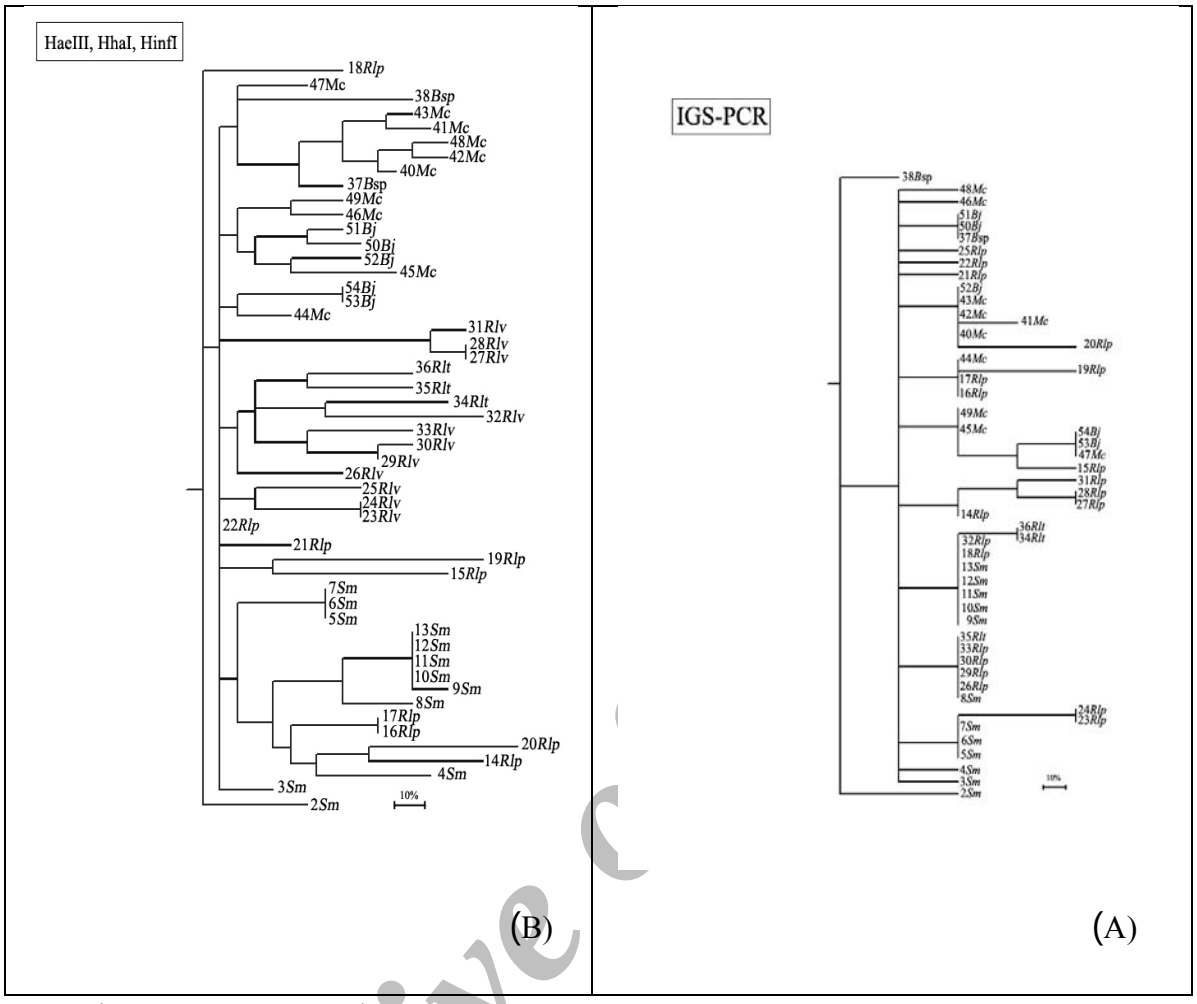
بطورکلی می توان روش IGS PCR-RFLP را بدلیل توانایی آن در تفکیک بین سویه ها همچنین بدلیل سادگی آن درمقایسه با دیگر روشهای مولکولی موجود برای مطالعه‌ی نحوه‌ی ارتباط ژنتیکی بین سویه ای و نیزگروه بندی سویه‌های ریزوبیومی مناسب دانسته و توصیه نمود. اولیویرا و همکاران (۱۹۹۹)، مارتینزو همکاران (۱۹۹۹) همچنین بارسیرو همکاران (۲۰۰۰) نیز تکنیک حاضر را به دلیل کارآمدی و اطمینان ، سادگی و نیازهای آزمایشگاهی کمتربرای تشخیص سریع ، توصیف و غربال کردن سویه های ریزوبیومی توصیه می کنند (۱، ۱۲، ۱۳).

۲ـ گروه بندی سویه های ریزوبیومی براساس پروفیل پلاسمیدی: پروفیل پلاسمیدی سویه های ریزوبیومی بروش اکهارت تهیه شد. دراین روش DNA پلاسمیدی تمامی ۵۲ سویه ریزوبیومی توسط سه ژل آگاروز ۰/۸ درصد با ابعاد 20×25 cm الکتروفورز و مقایسه‌ی پلاسمیدی بین سویه ها انجام پذیرفت. شکل ۲ پروفیل پلاسمیدی سویه های *Rlv* و *Rlt* را نشان می دهد. برای ترسیم دندوگرام مربوط به پروفیل پلاسمیدی سویه های ریزوبیومی نیز از نرم افزار Phylip version 3.6 a3 استفاده شد. دندوگرام مربوط به پروفیل پلاسمیدی سویه های *Rlp* و*Sm* نشان می دهد که تمامی سویه های مذکور در ۹ گروه قرار می گیرند. سویه های ۷ *Sm*، 6، 4 بدون اختلاف با یکدیگر بر روی بخشی از گروه یک قرار دارند ودرکنار آنها سویه ۲ *Sm*، با اختلاف نسبی حدود ۱۷ درصد قرار می گیرد. سویه های ۸ *Sm* و ۵ و ۳ نیز با اندکی اختلاف (حدود ۳۰ درصد) بر روی گروه ۲ و مابقی سویه های *Sm* شامل سویه ۱۳ *Sm* و ۱۲ و ۱۱ بدون اختلاف درکنار یکدیگر در گروه ۳ قرار دارند. تمامی سویه های *Rlp* درون گروه های ۵ و ۹ واقع شد و اعضای گروه ۵ (۱۷ *Rlp* و ۱٦ و ۱۵) بصورت یک گروه با تشابه درون گروهی حدود ۷۰ درصد ، ولی سویه های درون شاخه ۹ (۲۰ *Rlp* و ۱۹ و ۱۸ و ۱٤) با اختلافی بیش از ۳۰٪ درکنار هم قرار می گیرند.



شکل۲- پروفیل پلاسمیدی سویه های *Rlv, Rlt*

www.SID.ir



شکل۳- دندوگرام گروه بندی سویه های ریزوبیومی بر اساس 16S-23S IGS DNA (A) قبل از برش آنزیمی (B) بعد از برش توسط آنزیمها ی *Hae* III , *Hha* I , *Hinf* I

دندوگرام مربوط به پروفیل پلاسمیدی سویه های *Bsp* و *Rlt* و *Rlv* نشان می دهد بجز سویه های ۳۰ *Rlv* و۲۲ که بصورت مجزا قرار گرفته اند. سویه های ۲٤ *Rlv* و ۲۳ بدون اختلاف درگروه ۲ واقع می شوند و درکنار آنها سویه‌های ۲۹ *Rlv* و ۲۸ و ۲٦ و ۲۵ و بصورت یک گروه با تشابه حدود ۷۰ درصد قرار می گیرند. سویه‌های ۳۱ *Rlv* و ۲۷ نیز بدون اختلاف با یکدیگردرگروه ٦، همچنین سویه های ۳۳ *Rlv* و ۳۲ بدون اختلاف در کنار یکدیگر و همراه با سویه‌های ۳٦ *Rlt*و۳٤ درگروه ۸ قرار دارند. این سویه ها درکنارسویه های ۳۸ *Bsp* و ۳۷ بدون اختلاف همگی در گروه ۱۲ واقع می شوند.

دندوگرام سوم مربوط به سویه های *Bj* و *Mc* می باشد که دراین دندوگرام سویه های ٤٦ *Mc* و ٤٥ و٤٤ و ٤۳ و ٤۱ بدون اختلاف درون گروه اول قرار می گیرند ولی سویه‌ی ٤۹ *Mc* با سویه های قبل اندکی اختلاف دارد. سویه های ٤۸ *Mc* و ٤۲ نیز با اختلاف بیش از ۳۰ درصد درون گروه ۲ واقع می شوند. سویه ٤۷ *Mc* درکنار سویه های تند رشد ٥٤ *Bj* و ٥۳ قراردارند. سویه‌های کند رشد ٥۱ *Bj* و ٥۰ بدون اختلاف دریک گروه می باشند ولی سویه ٥۲ *Bj* اختلاف نسبتاً زیادی با آن دو سویه دارد.

درمجموع گروه بندی مبتنی بر پروفیل پلاسمیدی سویه های مختلف ریزوبیومی مورد استفاده دراین تحقیق تا حدودی با نتایج حاصل از روش IGS PCR-RFLP

Archive
www.SID.ir

هماهنگی دارد، بطور مثال سویه های ٥٤ *Bj* و ٥٣ ، سویه های ٢٤ *Rlv* و ٢٣ ، همچنین سویه های ١٧ *Rlp* و ١٦ و سویه های ١٣ *Sm* و ١٢ و ١١ درهردو روش بصورت کاملاً مشابه درکنار یکدیگرو درون گروههای کلاستری جداگانه ای قرار گرفته اند. ریگوتیر ـ گویس و همکاران (١٩٩٨) و لاگری و همکاران (١٩٩٢) نیز گزارش نمودند که همبستگی نسبی بین ژنوتیپهای سیمپلاسمیدی و ژنوتیپ های کروموزمی ریزوبیومها وجود دارد (١١، ١٩). البته قدرت تفکیک و تمایز بین سویه های ریزوبیومی در روش RFLP بیشتر از روش پروفیل پلاسمیدی است، بطوریکه از مجموع ٥٢ سویه تعداد ٤١ سویه (حدود ٧٩ درصد) از یکدیگر تفکیک شد در صورتیکه در روش پروفیل پلاسمیدی تنها تعداد ٢٦ سویه از مجموعه ٥٢ سویه ریزوبیومی (٥٢ درصد) با دیگر سویه ها متفاوت بوده و بین مابقی تفاوتی مشاهده نشد.

منابع

1. Bourcier, F. D., A. Willems, R. Coopman, G. Laguerre, M. Gillis ,and P. Lajudie. 2000. Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating small Senegalese legumes by 16S–23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3987-3997.
2. Chen, W. P., and T. T. Kuo. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram negative bacterial genomic DNA. Nucl. Acids Res. 21: 2260.
3. De Oliveria,V. M.,H. L. C. Coutinho, B. W. S. Sobral,C. T. Guimares, J. D. Van Elsas, and G. P. Manfio. 1999. Discrimination of Rhizobium tropici and R. leguminosarum strains by PCR specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis. Lett. Appl. Microbiol. 28:137-141.
4. Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid. 1:584-588.
5. Guo, X. W., X. X. Zhang, and F. Di Li. 1999. Characterization of Astragalus sinicus Rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and nodulation genes regions. Current Microbiol.39: 358-364.
6. Gurtler, V. and Stanisich, V.A.1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer. Microbiology 142: 3-16.
7. Jensen, M. A., J. A. Webster, and N. Straus.1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Appl. Environ. Microbiol. 59: 945-952.
8. Kostman, J.R. Edind, T.D., Lipuma, J.J. and Stull, T.L.1992.Molecular epidemiology of Pseudomonas Cepacia determined by polymerase chain reaction ribotyping. J.Clin Microbiol. 30,2084_2087.
9. Laguerre, G., M. R. Allard, F. Rovey, and N. Amarger. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbial. 60: 56-63.
10. Laguerre, G., P. Mavingui, M. R. Allard, M. P. Charnay, P. Louvrier, S. I. Mazurier, L. Rigottier-Gois, and N. Amarger. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism

عدم وجود همبستگی کامل بین دو روش مذکور ، صرف نظر از ماهیت دو روش ، احتمالاً به استعداد سویه های ریزوبیومی برای از دست دادن و یا دریافت مجدد پلاسمید نیز ارتباط دارد (١١).

سپاسگزاری: این تحقیق با حمایتهای مالی آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه لاوال انجام پذیرفته است، که بدینوسیله از مساعدتهای انجام شده تشکر و قدردانی بعمل می‌آید. همچنین از راهنمائی های دوست عزیز آقای دکتر محمود محمدی و نیز از آقای R. Kuwa کارشناس آزمایشگاه تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک ، مرکز تحقیقات علوم زیستی دانشگاه لاوال تشکر می شود. در پایان لازم است از مساعدت ریاست وقت مؤسسهٔ تحقیقات خاک و آب کشور استاد محترم آقای دکتر جعفر ملکوتی و نیز همکاران ایشان تشکر و سپاسگزاری بعمل آید.

Archive of SID

www.SID.ir

analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to Rhizobium leguminosarum and its different biovars. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2029-2036.

11. Laguerre, G., S. I. Mazurier, and N. Amarger. 1992. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of Rhizobium leguminosarum bv. Viciae in field populations. FEMS Microbiol. Ecol. 101: 17-26.

12. Martinez, J. G., S. G. Acinas, A. I. Anton, and F. R. Valera.1999. Use of the 16S-23S ribosomal gene spacer region in studies of prokaryotic diversity. J. Microbiol. Methods. 36: 55-64.

13. Martinez –Romero, E. and Caballero – Mellado .

1996 Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. Crit: Rev.Plant Sci. 15:113-140.

14. Normand, P., C. Ponsonnet, X. Nesme, M. Neyra, and P. Simonet. 1996. ITS analysis of prokaryotes. In Molecular Microbial Ecology Manual ed.Akkermans,A.D.L., van Elsas, J.D. and De Bruijn, F.J.Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic.

15. Nour, S. M.,J. C. Cleyet-Marel, D. Beck, A. Effosse, and M. P. Fernandez.1994a. Genotypic and phenotypic diversity of Rhizobium isolated from chickpea (Cicer arietinum L.).Can. J. Microbiol. 40: 345-354.

16. Nour, S. M., M. P. Fernandez, P. Normand, and J. C. Cleyet-Marel. 1994b. Rhisobium ciceri sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (Cicer arietinum L.). Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 511-522.

17. Perret, X., and W. J. Broughton. 1998. Rapid identification of Rhizobium strains by targeted PCR fingerprinting. Plant.Soil. 204: 21-34.

18. Quatrini, P., G. Scaglione, M. Caradonna and A. M. Puglia. 2002. Bradyrhizobium sp. nodulating the Mediterranean shrub spanish broom(Spartium junceum L.). J. Appl. Microbiol. 92: 13-21.

19. Rigottier-Gois, L., S. L. Turner, J. P. W. Young, and N. Amarger.1998. Distribution of repC plasmid-replication sequences among plasmids and isolates of Rhizobium leguminosarum bv. viciae from field populations. Microbiol. 144:771-780.

20. Roth, A., M. Fischer, M.E. Hamid, S. michalke , W. ludwing and H. mauch. 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J.clin. microbiol.36:139-147.

21. Somasegaran, P., and H. J. Hoben. 1994. Handbook for Rhizobia Methods in Legume-Rhizobium Technology.P.267-278. Springer-Verlag, New York.

Archive of SID

www.SID.ir

Genetic Grouping of Certain Indigenous Rhizobial strains by 16S-23S IGS PCR-RFLP and Plasmid Profile

Alikhani H.[1], Yakhchali B.[1,2], and Honey Antovan[3]

[1]**Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran**

[2]**National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran**

[3]**Faculty of Agriculture, Universite' Laval, Quebec, Canada**

Abstract

Among prokaryotes, there are certain soil bacteria known as rhizobacteria which are very significant owing to their N_2 fixation ability in legumes. The nucleotide sequence of the intergenic spacer (IGS) fragments residing between the 16S and 23S rRNA genes (16S-23S IGS) are not very conserved and thus are very useful in the grouping of rhizobial strains. In this research, 52 superior plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) were grouped based on 16S-23S IGS PCR-RFLP and plasmid profiles. The results showed that the 16S- 23S IGS fragments of different rhizobial strains vary in size (600-1486 bp) and the number of IGS copies (1-3 copies). Based on the 16S-23S IGS PCR-RFLP profiles all 52 strains were located in 48 groups with 11 groups showing 70% intraspecies similarity. By using the above method, 77% of the strains (except 12 strains *Bj* 53, *Bj* 54; *Rlv* 27, *Rlv* 28, *Rlv* 23, *Rlv* 24; *Rlp* 16, *Rlp* 17; *Sm* 10, *Sm* 11, *Sm* 12 and *Sm*13) were separated into different groups. Therefore, this simple method which possesses minimal lab requirements is highly reliable and applicable for the genetic grouping of rhizobacteria in comparison to other molecular methods. The grouping based on the plasmid profile of rhizobial strains was in agreement (to some extent) with the results of the 16S-23S IGS PCR-RFLP method. For example, grouping of the *Bj* 53, *Bj* 54; *Rlv* 23, *Rlv* 24; *Rlp* 16, *Rlp* 17 and *Sm* 11, *Sm* 12 and *Sm*13 strains in both methods were completely similar and located in separate cluster groups.

Key words: Rhizobial strains, 16S-23S IGS PCR-RFLP, plasmid profile, genetic grouping, PGPR

Archive of SID

www.SID.ir